УДК 619:616.98:578.821.2:636.22/.28:57.082.26

**Косарева О. А., Константинов А. В., Кукушкина М. С.**
*(Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГУ «ВНИИЗЖ»)*

# ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ГОНАД КОЗЫ К ВИРУСУ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ключевые слова: нодулярный дерматит, крупный рогатый скот, культура клеток, культивирование.

Введение.

Нодулярный дерматит относится к особо опасным инфекциям крупного рогатого скота и имеет широкое распространение в странах Африканского континента и Азии. В связи с ростом внешнеэкономических отношений, возможен занос возбудителя болезни и в нашу страну.

Нодулярный дерматит вызывается вирусом рода Capripoxvirus семейства Poxviridae. Это острое, подострое или бессимптомное заболевание у КРС, которое поражает животных любого возраста и породы. Болезнь характеризуется повышением температуры, генерализованными оспенными поражениями кожи и внутренних органов которые можно наблюдать в виде твердых высыпаний органических узелков на коже, и генерализованной лимфаденопатией. [1]

Нодулярный дерматит переносится жалящими насекомыми, особенно кровососущими, например, москитами и жигалками обыкновенными Stomoxys calcitrans. По данным Yeruhama I. и др. [2, 5] вспышка заболевания бугорчатки была вызвана мухами жигалками, занесенными ветром из очагов болезни, находящиеся на расстоянии 85 км. Передача возбудителя болезни от животного к животному может происходить контактным методом, однако он не играет важной роли во время эпизоотии. [2, 3] Идентификацию возбудителя проводят методом постановки РСК, ИФА и др.

Для выделения и культивирования вируса используют культуры клеток дермы КРС с минимальной поддерживающей средой, содержащей 5% фетальной телячьей сыворотки и гентамицин (исходное количество 50 мг/мл). [1] Вирус бугорчатки может также размножаться в культуре клеток тестикул ягненка и теленка, почек овцы, надпочечников ягненка, фетальных культурах мышц ягненка и теленка, почек эмбриона овцы и почек ягненка, фетальных культурах почки и кожи кролика, фибробластах куриных эмбрионов, в линии клеток взрослой мартышки – вервет (AVK 58) и в линии клеток почки сирийского хомячка (BHK/21). При первичном выделении вируса в монослое почки ягненка на растворе Хенкса с 0,5% гидролизата лактальбумина и 0,5% сыворотки КРС, цитопатогенные изменения (ЦПИ) наблюдались через 11 суток и протекали исключительно медленно. При серийном пассировании вируса в этой культуре, изменения становились заметными на 3 день. ЦПИ изначально проявлялись в виде отдельных фокусов или округлых групп и клеток с повышенной рефрактивностью. Фокусы постепенно увеличивались, вовлекая клетки окружающие их, новые фокусы возникали на оставшейся части клеточной поверхности, хотя некоторое количество пораженных клеток случайным образом отслаивались оставляя неправильной формы пробелы в клеточном слое. Большинство фокусов, как правило, оставались прикрепленными к поверхности стекла в течение продолжительного времени. В культурах, зараженных вирусной суспензией, данные фокусы или микроплашки могут учитываться и расцениваться как чувствительный вирусологический метод.

Проявление цитопатогенного изменения в монослое клеток почек ягненка показало, что улучшенные показатели выявлены при концентрации гидролизата лактальбумина 2%. На адаптированной культуре изменения, обусловленные действием вируса проявлялись в течение 24 часов, а полное поражение клеток через 48-72 часа. Значительное возрастание уровня цитопатогенного действия также наблюдалось в культуре почки ягненка с использованием поддерживающей среды на растворе Хенкса без гидролизата лактальбумина и сыворотки, со сниженной концентрацией электролитов. [4].

В настоящее время для получения вакцины против оспы овец и коз широко ис-

пользуется перевиваемая культура клеток гонад козы. Учитывая то, что возбудитель оспы овец и коз, а также возбудитель нодулярного дерматита КРС относятся к одному роду Capripoxvirus, целью наших исследований было изучить возможность адаптации вируса НД к указанной культуре клеток, определить степень накопления вируса в зависимости от количества пассажей, а также методом электронной микроскопии изучить его структуру. Идентификацию возбудителя проводили методом постановки РДСК, РДП и ИФА подтвердивших его специфичность.

Материалы и методы

Чувствительность перевиваемой культуры клеток гонад козы к вирусу нодулярного дерматита крупного рогатого скота штамма «Эфиопский» проводили методом последовательных пассажей с использованием патогенного материала в виде подкожной клетчатки, полученной от больного животного. С этой целью на 13 день после экспериментального заражения быка подвергли эвтаназии, получали отёчную подкожную клетчатку в области шеи, в местах наибольших специфических поражений кожи, которую растирали в ступке в стерильных условиях с добавлением ФБР pH 7,6, дважды замораживали при минус 60°С и оттаивали при комнатной температуре. Затем суспензию центрифугировали при 2000 об/мин, в надосадочную вируссодержащую жидкость вносили антибиотики пенициллин 100 ед/см3, стрептомицин 100 ед/см3 и гентамицин 100 ед/см3.

Полученую суспензию инокулировали по 10 см$^3$ в 1,5 литровые клинские матрасы с монослоем 48-72 часовой перевиваемой культурой клеток гонад козы.

Монослойную культуру клеток заражали с адсорбцией вируса на клетках. Вирус вносили после удаления ростовой среды, инкубировали при 37°С в течение 1 часа, а затем вносили поддерживающую среду. Для культивирования вируса использовали поддерживающую среду Игла и ПСП с содержанием 1 – 2 % нормальной сыворотки КРС. Репродуктивную способность вируса оценивали по времени появления ЦПД, интенсивности его развития и накоплению вируса.

Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД50/см3. Сбор вируса производили при проявлении ЦПД на 70-90% площади монослоя. Полученный вирус хранили при температуре минус 40°С. Всего было проведено 8 пассажей (срок наблюдения).

В дальнейшем с целью изучения структуры вируса нодулярного дерматита, его исследовали под электронным микроскопом.

Результаты и обсуждения.

Было установлено, что вируссодержащая суспензия, приготовленная из патогенного материала, при заражении 48-72 часовой перевиваемой культуры клеток гонад козы вызывала специфическую дегенерацию клеток. При этом сроки обусловившие наличие ЦПД на площади 70-90% монослоя клеток и его накопление, зависели от количества проведенных пассажей. При проведении первого пассажа деструкция клеток наступала через 5 суток. При этом титр полученного вируса был 4,0 lg ТЦД$_{50/см}{}^3$. В дальнейшем сроки действия вируса сокращались. Вирус 2го и 3го пассажей вызывал дегенерацию клеток через 3 суток. В этом случае отмечено увеличение титра вируса в пределах 5,0 – 5,33 lg ТЦД$_{50/см}{}^3$ соответственно.

После проведения 4го и 5го пассажей сроки культивирования вируса НД сокращались до 2х суток. Однако при этом выявлено некоторое снижение титра инфекционной активности вируса, который был 4,66 – 4,91 lg ТЦД$_{50/см}{}^3$ соответственно.

При проведении 6го, 7го и 8го пассажей сроки специфической дегенерации клеток выявлены в течение 3х суток, а 8го - на 5ые сутки. Титр вируса был 5,5; 4,5 и 4,5 lg ТЦД50/см3, соответственно.

Как видно из представленных данных при культивировании вируса НД в перевиваемой культуре клеток гонад козы наиболее выраженное накопление вируса нодулярного дерматита КРС отмечено в течение 1-6 пассажей в пределах 4,0 – 5,5 lg ТЦД$_{50/см}{}^3$.

В дальнейшем для изучения морфологии вируса нодулярного дерматита КРС монослой клеток гонад козы с выраженным ЦПД, полученный в клинских матрасах, механическим путем снимали со стекла, предварительно слив питательную среду, ресуспендировали 0,01 М фосфатным буферным раствором в объеме уменьшенным в 200 раз по сравнению с первоначальным объемом питательной среды. Полученную концентрированную суспензию вируса для разрушения клеток замораживали при минус 60°С, оттаивали при комнатной температуре и для осаждения клеточного детрита центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 минут. Инфекционный титр, надосадочной вируссодержащей жидкости при титровании

в культуре клеток гонад козы, составлял 107,5 lg ТЦД$_{50/см}^3$. В дальнейшем методом центрифугирования через слой 20% сахарозы при 20000 g в течение 1,5 часов проводили очистку надосадочной жидкости. Полученный вирусный препарат исследовали под электронным микроскопом (JEM 100 B), используя негативное контрастирование 4% раствором фосфатно – фольфрамовой кислоты рН 6,8.

Изучение вируса нодулярного дерматита КРС методом электронной микроскопии показало, что он имеет типичную структуру каприпоксвирусов, размер по большой оси – форма эллипса 150х200 нм, по малой оси – сферическая форма 180х200 нм (рис.)



Рис. Морфология вирионов вируса нодулярного дерматита КРС увеличение × 60000 (исследования проведены совместно с д.б.н. А.П. Пономаревым)

Заключение

1. Установлена чувствительность перевиваемой культуры клеток гонад козы к вирусу нодулярного дерматита крупного рогатого скота. Сроки культивирования вируса составляли 2-3 суток, а инфекционный титр в культуре клеток достигал величины 5,5 lg ТЦД$_{50/см}^3$.

2. Морфология вирионов ВНД соответствовала структуре каприпоксвирусов.

**Резюме**: Установлена высокая чувствительность перевиваемой культуры клеток гонад козы к вирусу нодулярного дерматита крупного рогатого скота (ВНД). По морфологии ВНД соответствует структуре каприпоксвирусов.

**SUMMARY**

High sensitivity of continuous goat gonad cell culture to bovine lumpy skin disease virus (LSDV) was determined. According to its morphology LSD virus corresponds to capripoxvirus structure.

Keywords: lumpy skin disease, cattle, cell culture, cultivation.

Литература

1. Absence of lumpy skin disease virus in semen of vaccinated bulls following vaccination and subseguent experimental infection / U.I. Osuagwuh, V. Bagla, E.H. Venter [et al]. // Vaccine. – 2007. – Vol. 25, № 12. - P. 2238-2243.

2. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) / C. M. Chihota, L. F. Rennie, R. P. Kitching, P.S. Mellor. // Epidemiol. Infect. - 2001. - Vol. 126. - P. 317-321.

3. Lumpy skin disease / Barnard B. J., Munz E., Dumbell K., Prozesky L.// Coetzer JAW. Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa / ed - Cape Town, 1994. - P. 604–612.

4. Lumpy skin disease // Virol. Monogr. Weiss K. E. ted, 1 - 1968. Vol. 3. - P. 111–131.

5. Spread of lumpy skin diseas in Israeli drairy herds // Yeruham I., Nir O., Braverman Y., [et al]. Vet. Rec. 1995. - Vol. 137, N 4. – P. 91 – 93.

Контактная информации об авторах для переписки
**О. А. Косарева** – ведущий технолог ОБТК, аспирантка,
**А. В. Константинов** – начальник ОБТК, канд. ветер. наук,
**М. С. Кукушкина** – руководитель сектора, канд. биолог. наук.
Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГУ «ВНИИЗЖ»)
600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец
тел.\факс: (4922) 26-38-77, (4922) 26-06-14, (4922) 26-19-14
E-mail: mail@arriah.ru
E-mail: kosarevaolgaalex@yahoo.com

УДК: 619: 616.9: 636.4

**Скворцов В.Н., Сафонова Н.А., Балбуцкая А.А., Маханев В.В., Войтенко А.В.**
*(ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко)*

# АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ОФЛОКСАЦИНА В ОТНОШЕНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ключевые слова: антибиотики, фторхинолоны, офлоксацин, микроорганизмы, чувствительность, резистентность.

Введение

Антибактериальные препараты – одно из величайших достижений XX века. Они выступают в роли приоритетных специфических лекарственных средств при патологических состояниях инфекционной этиологии как у людей, так и животных. Однако их широкое и не всегда рациональное применение способствует появлению и распространению микроорганизмов с повышенной резистентностью к антимикробным препаратам. Особенно опасна тенденция выработки у бактерий мультирезистентности. Поэтому оптимизированное назначение такого рода медикаментов наиболее результативно [2].

В последние годы при лечении животных, инфицированных лекарственнорезистентными формами микроорганизмов, чаще стали использовать фторхинолоны. В этой связи особый интерес представляет офлоксацин – трициклический монофторхинолон.

Обладая обширным диапазоном бактериостатического действия в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, а также возбудителей с внутриклеточной локализацией офлоксацин зарекомендовал себя как препарат, обладающий широкими показаниями к применению [1].

Целью нашей работы явилось изучение антимикробной активности офлоксацина в отношении микроорганизмов, выделенных от животных с различными патологиями.

Материалы и методы

Определение антибактериальной чувствительности к офлоксацину проводили диско-диффузионным методом. В опытах было использовано: 36 штаммов Escherichia coli, выделенных от птиц; 31 штамм Escherichia coli, выделенных от свиней; 15 штаммов Salmonella enteritidis, выделенных от цыплят; 40 штаммов Staphylococcus hyicus, выделенных от свиней; 12 штаммов Staphylococcus pseudintermedius, выделенных от собак; 11 штаммов Staphylococcus aureus, выделенных от свиней и птиц; 6 штаммов Streptococcus spp., выделенных от свиней; 4 штамма Pasteurella multocida; 7 штаммов Pseudomonas aeruginosa, выделенных от свиней и птиц. Интерпретацию результатов оценивали по одной из трех категорий: чувствительный, промежуточный и резистентный штамм.

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) офлоксацина определяли